

Н. В. Гукасова<sup>1,\*</sup>, И. А. Тубашева<sup>1</sup>, С. Л. Кузнецов<sup>1</sup>, А. И. Муравьева<sup>1</sup>,  
С. В. Алешин<sup>1</sup>, В. В. Соколов<sup>2</sup>, Т. А. Антипова<sup>3</sup>, Е. А. Воронцов<sup>1</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТОПОЗИДА В ВИДЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ И СВОБОДНОЙ СУБСТАНЦИИ

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, Россия, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

\* e-mail: nvguk@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБУН Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, Россия, 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3; e-mail: vasyasokol@list.ru

<sup>3</sup> ОАО "Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения", Россия, 117149, Москва, Симферопольский б-р, д. 8; e-mail: antitanja@rambler.ru

Получена полимерсодержащая лекарственная форма этопозид (ПФЭ) в виде субмикронных частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). Проведено сравнительное исследование фармакокинетики и биораспределения этопозид в крови и органах крыс после однократного внутривенного (в/в) введения полимерной формы и субстанции этопозид в дозе 10 мг/кг (по действующему веществу). Сравнение фармакокинетических параметров ПФЭ и субстанции этопозид показало, что при использовании ПФЭ происходит замедление процессов всасывания и выведения этопозид из организма крыс, о чем свидетельствует увеличение значений  $T_{1/2}$ ,  $MRT$  и уменьшение значений  $K_{el}$ ,  $C_{max}/AUC_{(0-48)}$  и  $Cl$ . Наибольшая тканевая доступность ( $f_i$ ) при введении ПФЭ отмечается для печени и легких. Изучено накопление этопозид в опухолевой ткани после однократного в/в введения ПФЭ и субстанции этопозид в дозе 25 мг/кг мышам с привитой аденокарциномой молочной железы мыши Ca755. Значение коэффициента распределения этопозид между кровью и опухолевой тканью через 1 и 24 ч оказалось выше в случае ПФЭ, что свидетельствует о более высоком накоплении этопозид в опухолевой ткани при использовании ПФЭ.

**Ключевые слова:** этопозид; сополимер молочной и гликолевой кислот; фармакокинетика; тканевая доступность; биораспределение.

Противоопухолевый препарат этопозид относится к полусинтетическим эпиподофиллотоксинам, производным 4'-диметилэпиподофиллотоксина, содержащегося в экстракте мандрагоры, и применяется в качестве противоопухолевого средства [1 – 3]. Для существующих препаратов на основе субстанции этопозид актуальной является проблема разработки новых лекарственных форм, улучшающих их фармакокинетику и повышающих накопление препарата в опухолевой ткани.

Анализ литературных данных позволяет заключить, что наиболее перспективным подходом, позволяющим решить эти задачи, является разработка форм в виде полимерсодержащих частиц [4 – 6]. Применение таких лекарственных форм способствует повышению накопления препарата в опухолевой ткани и снижению токсичности для здоровых тканей организма, что является крайне актуальной задачей в случае использования высокотоксичных противоопухолевых препаратов, каким является этопозид [7].

В литературе имеются данные о разработке лекарственных форм этопозид в виде ПЭГилированных липосом и наносуспензионной формы на основе бычьего сывороточного альбумина, для которых показано повышение биодоступности и пролонгированность действия [8, 9]. Нами ранее была разработана методика получения полимерной формы этопозид (ПФЭ) в

виде частиц субмикронного размера на основе коммерчески доступного биосовместимого полимера — сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) [10].

Целью настоящей работы является исследование фармакокинетики и биораспределения этопозид из разработанной ПФЭ по сравнению со свободной субстанцией этопозид.

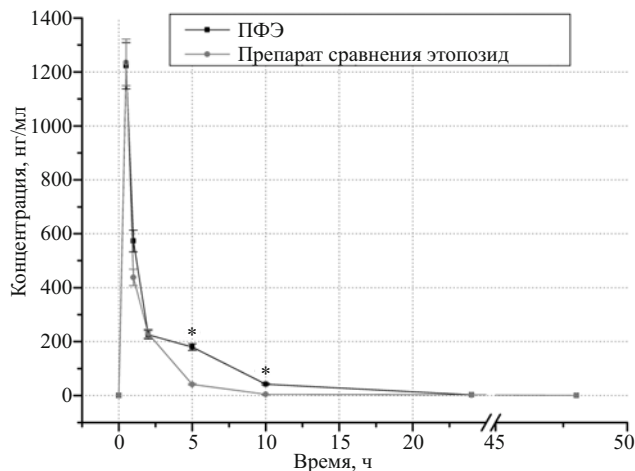
### Экспериментальная часть

**ПФЭ на основе биосовместимого биodeградируемого сополимера PLGA.** Получение ПФЭ осуществляли известным методом одинарных эмульсий с использованием субстанции этопозид [10].

Определение содержания этопозид в ПФЭ проводили методом ВЭЖХ [10], размера частиц — методом динамического светорассеяния [10].

**Фармакокинетика и биораспределение этопозид в плазме крови и тканях органов крыс.** При проведении исследований использовали крыс-самок белой популяции Wistar массой 180 – 200 г, полученных из питомника лабораторных животных ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных до начала исследования содержали в условиях карантина 14 дней.

Исследования по фармакокинетике и биораспределению выполнены с помощью параллельного дизайна



**Рис. 1.** Усредненные фармакокинетические кривые ПФЭ и препарата сравнения этопозид в плазме крови крыс после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения этопозид в дозе 10 мг/кг. \* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).

согласно методическим руководствам и нормативным документам по проведению доклинических исследований в Российской Федерации [11]. Животные разделены на 2 группы. Опытной группе вводили ПФЭ, группе сравнения — субстанцию этопозид (Etoposide, 99 %, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США).

#### Подготовка образцов биологического материала.

Для исследования фармакокинетики этопозид в плазме крови и тканях органов (легкие, печень, почки) крыс проводили однократное введение ПФЭ и препарата сравнения внутрибрюшинным способом (в/б). Доза составляла 10 мг/кг по действующему веществу. Величину дозы выбирали из диапазона, в котором у животных реализуется желаемый эффект фармакологического средства без признаков побочного действия [11]. Согласно результатам ранее проведенных исследований противоопухолевой активности на мышах, терапевтически эффективные дозы находятся в диапазоне 20 – 25 мг/кг [12]. При пересчете, в соответствии с правилами межвидового переноса дозировок с мыши на крысу [11], значение дозы составило 10 мг/кг. ПФЭ вводили животным в/б в виде суспензии препарата в физиологическом растворе. Препарат сравнения — субстанцию этопозид — вводили в виде раствора в растворителе следующего состава: диме-

тилсульфоксид (DMCO), кремофор (Cremophor EL, CAS 61791 – 12 – 6, EMD Millipore, США) и физиологический раствор в объемном соотношении 3:15:82 соответственно.

У животных отбирали образцы крови и тканей до введения препаратов (контрольные пробы) и через 0,5; 1; 2; 5; 10; 24; 48 ч после введения (опытные пробы). На каждую дискретную временную точку брали по 6 животных.

Пробы крови крыс отбирали в процессе декапитации в пластиковые центрифужные пробирки типа “эппендорф” в объеме, достаточном для получения 0,5 мл плазмы крови. Из крови готовили плазму обычным способом: кровь собирали в пробирки, предварительно обработанные гепарином (5000 МЕ), инкубировали, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. К 300 мкл исследуемой плазмы, помещенной в центрифужные пробирки вместимостью 2 мл, прибавляли 900 мкл ацетонитрила, встряхивали на шейкере типа вортекс, затем центрифугировали в течение 10 мин при 15000 об/мин, после чего отбирали 800 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в вials для хроматографа. Ткани исследуемых органов крыс (печень, почки, лёгкие) извлекали, измельчали ножницами и подвергали гомогенизации. К 150 мг образца гомогената (точная навеска), помещенным в центрифужные пробирки вместимостью 2 мл, прибавляли 900 мкл ацетонитрила и далее проводили пробоподготовку как описано выше.

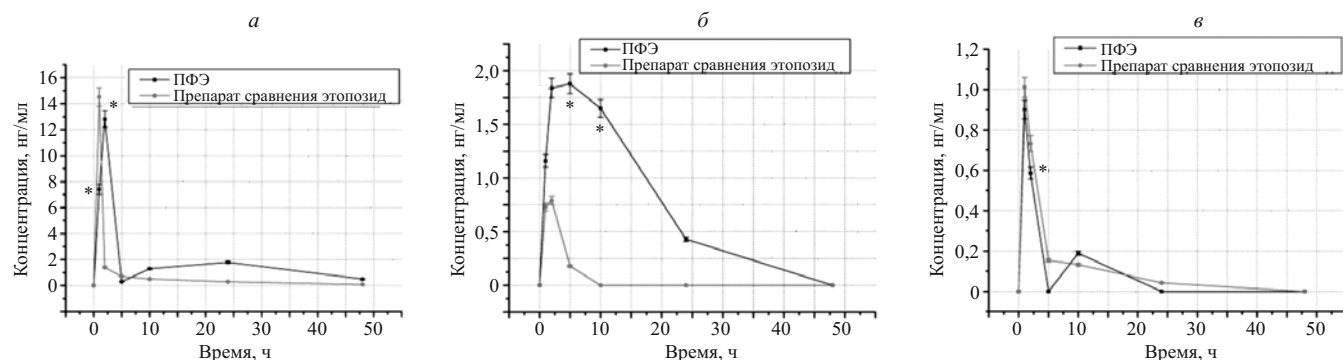
**Количественное определение этопозид в биологическом материале.** В работе использован жидкостный хроматограф Agilent 1290 series с масс-селективным детектором с тройным квадруполом (6400), оснащенным градиентным насосом, термостатом колонок, автосамплером (Agilent Technologies, США); колонка Perfectsil MZ-micro2 C8 5 × 100 × 2.1 (MZ-Analysentechnik, Германия).

Определение этопозид в образцах осуществляли методом ВЭЖХ с масс-селективным детектором в соответствии с методикой [13] с модификацией условий пробоподготовки и хроматографирования для достижения оптимальных валидационных и хроматографических характеристик. Условия проведения ВЭЖХ: температура термостата 30 °С, подвижная фаза — элюент А: ацетонитрил — 90 %, элюент В: 10 мМ водный раствор формиата аммония 10 %. Скорость пото-

**Таблица 1**  
Значения фармакокинетических параметров ПФЭ и препарата сравнения этопозид для плазмы крови крыс после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения этопозид в дозе 10 мг/кг

Орган крыс	Препарат	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{(0-48)}$ , нг · ч/мл	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	$Cl$ , л/(ч · кг)	$V_d$ , л	Скорость всасывания, $C_{max}/AUC_{(0-48)}$	$MRT$ , ч
Плазма крови	ПФЭ	1223,0 ± 85,6	0,5	2670,9 ± 186,9*	0,25 ± 0,02	2,77 ± 0,19	3,74 ± 0,26	14,96 ± 1,05	0,46 ± 0,01	4,0 ± 0,28
	Этопозид	1235,0 ± 86,4	0,5	1658,6 ± 116,1	0,43 ± 0,02	1,61 ± 0,11	6,03 ± 0,42	14,02 ± 0,98	0,74 ± 0,04	2,33 ± 0,16

\* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 2.** Усредненные фармакокинетические кривые ПФЭ и препарата сравнения этопозид в печени (а), легких (б), почках (в) после однократного в/б введения ПФЭ и этопозид в дозе 10 мг/кг. \* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).

ка 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы 2 мкл. Время регистрации хроматограммы 2 мин. Время удерживания этопозид около 0,75 мин. Детекция в электро-спрее: позитивная ионизация (MRM(E+)),  $m/z$  612,6  $\rightarrow$  229,0. Полученные при хроматографировании данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Mass Hunter Quantitative Analysis, version B.03.01, Agilent Technologies, США.

Методика количественного определения этопозид в плазме крови крыс была валидирована по параметрам: сходимость, специфичность, линейность, точность, прецизионность, предел обнаружения и предел количественного определения. Предел количественного определения этопозид по данной методике составил 1 нг/мл.

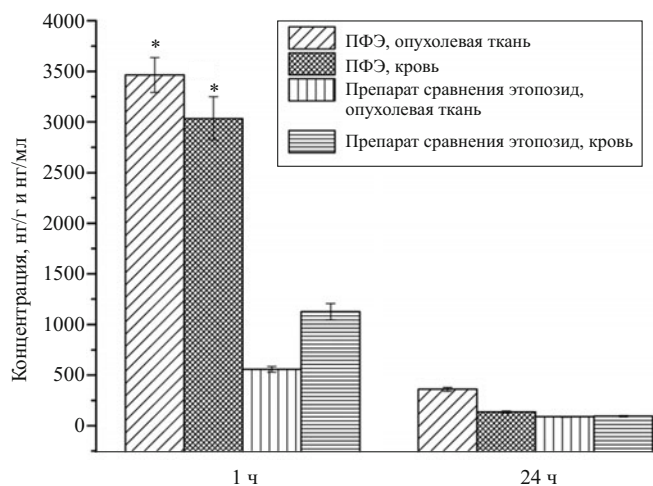
**Биораспределение этопозид в опухолевой ткани.** В работе были использованы микроскоп Nikon (Япония); линия клеток аденокарциномы молочной железы мыши Ca755; мыши-самки линии C57Bl/6 массой 22 – 25 г, источник животных — питомник лабораторных животных ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных до начала исследования содержали в условиях карантина 14 дней.

Исследование накопления этопозид в опухолевой ткани проводили на мышах с привитой аденокарциномой молочной железы мыши Ca755. Опухолевые клетки инокулировались подкожно, в подлопаточную область, в дозе  $10^6$  опухолевых клеток. После перевивки опухоли у мышей производили измерение размеров опухоли с определением её объема в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11]. Введение препаратов проводили на 14 день после прививки опухоли (объем опухоли на момент введения составлял 4000 – 5000 мм<sup>3</sup>) однократно в/б в дозе 25 мг/кг (в пересчете на действующее вещество). У животных отбирали пробы крови и опухолевой ткани до введения препаратов (контрольные пробы) и через 1 и 24 ч (опытные пробы). Для каждой определяемой временной точки брали по 3 животных. Опухолевый материал извлекали, измельчали ножницами и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора. Дальнейшую подготовку проб и определение содержания этопозид проводили как описано выше.

**Таблица 2**  
**Значения фармакокинетических параметров ПФЭ и препарата сравнения этопозид для печени, легких и почек крыс после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения этопозид в дозе 10 мг/кг.**

Орган крыс	Препарат	$C_{\max}$ , нг/г	$T_{\max}$ , ч	$AUC_{(0-48)}$ , нг · ч/г	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	Скорость всасывания, $C_{\max}/AUC_{(0-48)}$	MRT, ч	$f_T$
Печень	ПФЭ	12840 ± 634,84	2	85774,5 ± 4202,95*	0,067 ± 0,003	10,4 ± 0,51	0,15 ± 0,01	14,90 ± 0,75	32,11 ± 1,6
	Этопозид	14517 ± 696,82	1	32121 ± 1606,05	0,118 ± 0,006	5,9 ± 0,29	0,46 ± 0,02	8,50 ± 0,43	19,37 ± 0,96
Легкие	ПФЭ	1878 ± 90,14	5	36214,50 ± 1756,40*	0,09 ± 0,006	7,6 ± 0,53	0,05 ± 0,004	11,02 ± 0,77	13,56 ± 0,66
	Этопозид	792 ± 39,60	2	3033 ± 148,62	0,40 ± 0,02	1,73 ± 0,09	0,26 ± 0,02	2,47 ± 0,17	1,83 ± 0,09
Почки	ПФЭ	900 ± 43,92	1	3865,5 ± 190,96	0,182 ± 0,009	3,81 ± 0,19	0,23 ± 0,02	5,48 ± 0,38	1,45 ± 0,07
	Этопозид	1011 ± 45,39	1	5139, ± 257,46	0,39 ± 0,07	5,21 ± 0,26	0,19 ± 0,01	7,53 ± 0,53	3,09 ± 0,15

\* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Концентрация этопозида в гомогенате опухолевой ткани и плазме крови мышей после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения субстанции этопозида в дозе 25 мг/кг мышам с привитой аденокарциномой молочной железы мыши Ca755. \* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и их обсуждение

Общий состав ПФЭ, используемой для изучения фармакокинетики и биораспределения в тканях органов, приведен в работе [10]. Содержание этопозида в ПФЭ равно 8 %. Средний диаметр частиц составил около 440 нм.

**Сравнительная фармакокинетика этопозида в плазме крови крыс после в/б введения ПФЭ и свободной субстанции.** На основании результатов ВЭЖХ строили усредненные фармакокинетические кривые зависимости концентрация — время. Обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ OriginPro 8.5.0 (OriginLab Corporation, США) и Excel (Microsoft, США) для персонального компьютера. На рис. 1–3 и в табл. 1–3 данные представлены в виде средних арифметических значений и соответствующих им стандартных отклонений.

На рис. 1 представлены усредненные фармакокинетические кривые этопозида в плазме крови крыс после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравне-

ния субстанции этопозида. Введение препарата в составе ПФЭ привело к изменению фармакокинетического профиля по сравнению с введением субстанции. В случае введения ПФЭ наблюдается увеличение в 1,6 раза площади ( $AUC_{(0-48)}$ ) под кривой “концентрация — время”. Анализ фармакокинетических параметров (период полувыведения  $T_{1/2}$ , среднее время удерживания вещества в организме  $MRT$ , скорость всасывания исследуемых препаратов  $C_{max}/AUC_{(0-48)}$ , и константа элиминации  $K_{el}$ , табл. 1) показывает, что имеет место замедление процессов как всасывания, так и выведения этопозида из организма крыс при использовании ПФЭ.

**Сравнительная фармакокинетика и биораспределение этопозида в печени, легких и почках крыс после в/б введения ПФЭ и свободной субстанции.** При исследовании уровня концентрации этопозида в печени, легких и почках после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения также выявлено изменение формы фармакокинетических кривых (рис. 2) и рассчитанных по ним параметров (табл. 2).

Анализ фармакокинетических параметров показал, что для печени и легких, также как и для крови, характерно увеличение значений  $T_{1/2}$ ,  $MRT$  и уменьшение значений  $K_{el}$ ,  $C_{max}/AUC_{(0-48)}$ . Наибольшая тканевая доступность ( $f_T$ ) при в/б введении ПФЭ отмечается для печени. Стоит отметить, что тканевая доступность для легких при введении этопозида в виде ПФЭ в 7,51 раза выше по сравнению с субстанцией этопозида, что может иметь важное клиническое значение, так как препараты этопозида активно применяют при лечении злокачественных новообразований легких (например, при мелкоклеточном и немелкоклеточном раке легких).

**Сравнительное биораспределение этопозида в опухолевой ткани мышей после в/б введения ПФЭ и свободной субстанции.** Были рассчитаны коэффициенты распределения ( $K_d$ ) этопозида между кровью и опухолевой тканью, определяемые отношением соответствующих концентраций через 1 и 24 ч (табл. 3) для ПФЭ и препарата сравнения. В обе временные точки коэффициенты были выше у этопозида в виде ПФЭ, что свидетельствует о более высоком уровне накопления этопозида в опухолевой ткани в случае использования полимерной формы. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей по изучению накопления препаратов в опухолях при использовании полимерных или липидных форм паклитаксела, доцетаксела, цисплатина [14–17].

В проведенных нами ранее исследованиях [12] было показано наличие более высокой противоопухолевой активности и пролонгированного действия ПФЭ по сравнению с субстанцией этопозида на модели перевиваемой опухоли мышей *in vivo*. Этот эффект, по-видимому, может являться следствием достигнутых изменений фармакокинетических параметров ПФЭ.

Таким образом, результаты исследований продемонстрировали, что введение разработанной полимерной формы этопозида приводит к изменению основ-

Таблица 3

**Коэффициент распределения ( $K_d$ ) этопозида между кровью и опухолевой тканью мышей после однократного в/б введения ПФЭ и препарата сравнения субстанции этопозида в дозе 25 мг/кг мышам с привитой аденокарциномой молочной железы мыши Ca755**

Время, ч	$K_d$	
	ПФЭ	препарат сравнения
1	1,14 ± 0,06	0,50 ± 0,03
24	2,60 ± 0,13*	0,94 ± 0,05

\* Различия между группами с введением ПФЭ и препарата сравнения по критерию Стьюдента достоверны ( $p < 0,05$ ).

ных фармакокинетических параметров по сравнению с введением свободной формы этопозиды, в том числе наблюдается замедление процессов всасывания и выведения этопозиды из организма, а также более высокий уровень накопления этопозиды в опухолевой ткани.

Работа выполнена при поддержке Соглашения о предоставлении субсидии №14.604.21.0072 по теме: “Разработка технологии получения полимерных форм препаратов для лечения онкологических заболеваний” в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы”. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0072.

## ЛИТЕРАТУРА

1. J. A. Sinkule, *Pharmacotherapy*, **4**(2), 61 – 73 (1984).
2. D. H. Johnson, F. A. Greco, J. Strupp, et al., *J. Clin. Oncol.*, **8**(10), 1613 – 1617 (1990).
3. K. R. Hande, *Eur. J. Cancer*, **34**(10), 1514 – 1521 (1998).
4. W. Y. Qian, D. M. Sun, R. R. Zhu, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 5781 – 5792 (2012).
5. R. Saadati, S. Dadashzadeh, Z. Abbasian, et al., *Pharm. Res.*, **30**(4), 985 – 995 (2013).
6. J. Yordanov, R. Skrobanska, A. Evangelatov, *Colloids Surf B Biointerfaces*, **101**, 215 – 222 (2013).

7. M. Snehathala, K. Venugopal, R. N. Saha, et al., *Drug Deliv.*, **15**(5), 277 – 287 (2008).
8. Z. Wang, Z. Li, D. Zhang, et al., *Drug. Deliv.*, **22**(1), 79 – 85 (2015).
9. S. Jun, C. Yi, M. Fangli, et al., *Abstrs. Of the International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology*, Macao (2012), DOI: 10.1109 / iCBEB.2012.312.
10. А. И. Муравьева, Е. А. Воронцов, Н. В. Гукасова и др., *Рос. нанотехнол.*, **11**(3 – 4), 84 – 91 (2016).
11. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2012).
12. Г. А. Посыпанова, Л. Б. Горшкова, А. В. Родина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **50**(8), 45 – 49 (2016); *Pharm. Chem. J.*, **50**(8), 543 – 547 (2016).
13. M. C. Pigatto, D. L. Mossmann, T. Dalla Costa, *Biomed. Chromatogr.*, **29**(4), 529 – 536 (2015).
14. A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **75**(1), 1 – 18 (2010).
15. T. Musumeci, C. A. Venturab, I. Giannone, et al., *Int. J. Pharm.*, **325**(1 – 2), 172 – 179 (2006).
16. J. H. Parkas. Kwon, M. Lee, H. Chunga, et al., *Biomaterials*, **27**, 119 – 126 (2006).
17. L. Harivardhan Reddya, R. K. Sharma, K. Chuttani, et al., *J. Control. Rel.*, **105**(3), 185 – 198 (2005).

Поступила 22.11.17

## COMPARATIVE PHARMACOKINETICS AND BIODISTRIBUTION OF ETOPOSIDE IN A POLYMERIC DRUG FORM AND FREE SUBSTANCE

N. V. Gukasova<sup>1</sup>, I. A. Tubasheva<sup>1</sup>, S. L. Kuznetsov<sup>1</sup>, A. I. Murav'eva<sup>1</sup>, S. V. Aleshin<sup>1</sup>, V. V. Sokolov<sup>2</sup>, T. A. Antipova<sup>3</sup>, and E. A. Vorontsov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Center “Kurchatov Institute,” Moscow, 123182 Russia

<sup>2</sup> V. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow, 117638 Russia

\* e-mail: nvguk@mail.ru

A polymeric form of etoposide (PFE) in the form of submicron particles based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) was obtained. A comparative study of the pharmacokinetics and biodistribution of etoposide in the blood and organs of rats after single intraperitoneal (i.p.) administration of the PFE and parent substance of etoposide at a dose of 10 mg/kg (according to the active substance) was performed. Comparative analysis of the pharmacokinetic parameters demonstrated that the use of PFE slowed down the absorption of etoposide and its excretion from the body of rats, as evidenced by increase in the values of  $T_{1/2}$ ,  $MRT$  and decrease in the values of  $K_{ep}$ ,  $C_{max}/AUC_{(0-48)}$ , and  $Cl$ . The maximum tissue availability ( $f_t$ ) of etoposide in the case of PFE introduction was observed in the liver and lungs. The accumulation of etoposide in tumor tissue after single i.p. injection of PFE and etoposide substance at a dose of 25 mg/kg in mice with transplantable Ca755 mammary adenocarcinoma was studied. The value of the partition coefficient of etoposide between blood and tumor tissue after 1 and 24 h was greater in the case of PFE, which indicates a higher accumulation of etoposide in the tumor tissue when using PFE.

**Keywords:** etoposide; copolymer of lactic and glycolic acids; pharmacokinetics, tissue availability, biodistribution.